



УДК 577.164.1:543.867.

Рибофлавин: биологические, медицинские и экологические аспекты

А.А.Чиркин, М.В. Горовая

История открытия и изучения [1]:

1879, Blyth – открытие желтой флуоресценции водорастворимых естественных веществ.

1916, McCollum и Kennedy описали водорастворимую фракцию В, содержащую субстанции против заболевания бери-бери.

1920, Emmett и Luros, 1926, Smith и Hendrick описали термостабильный анти-пеллагрический фактор, названный В₂. Этот комплекс желтых ростовых факторов стал называться в Англии рибофлавином, а в США витамином G.

1933, Kuhn et al., Ellinger et al., Booher связали желтую флуоресценцию витамина В₂ с химическим строением рибофлавина.

1932–1934, открытие рибофлавина в молоке (лактофлавин), яйцах (овофлавин), печени (гепатофлавин) и моче (урофлавин). Warburg и Christian в Германии (1932) описали дыхательный фермент из дрожжей, содержащий рибофлавин и названный «старый желтый фермент». Двумя годами позже Stern и Holiday показали, что кофактор желтого фермента содержит производное аллоксазина, а Theorell продемонстрировал, что этот кофактор является фосфорным эфиром.

1935, Kuhn в Гейдельберге и Karrer в Цюрихе синтезировали витамин В₂.

1937, Theorell выделил и расшифровал строение ФМН (флавиномононуклеотид).

1938, Warburg и Christian выделили и расшифровали строение ФАД (флавинадениндинуклеотид) как кофактора D-аминоксидаз.

1981, Merrill et al. показали, что не менее 4-х 8α-модифицированных форм ФАД ковалентно связаны с апопротеинами ферментов клеток животных – N(3)-гистидил-связывание у сукцинат- и саркозиндегидрогеназ во внутренней мембране митохондрий, S-цистеинил-связывание у моноаминоксидазы в наружной мембране митохондрий и N(1)-гистидил-связывание у L-глуконолактоноксидазы в микросомальной фракции клеток печени.

Химия витамина В₂ [1,2].

Рибофлавин является 6,7-диметил-9-(1'-D-рибитил)изоаллоксазином; в американской литературе 7,8-диметил-10-(1'-D-рибитил)изоаллоксазин. Молекулярная масса рибофлавина 376,4, т.е. 1 мг рибофлавина = 2,66 мкмоль. Полиморфные кристаллы желто-оранжевого цвета, горького вкуса. Игольчатые кристаллы имеют температуру плавления 282 °С (с разложением). Пластинчатые кристаллы плавятся при 290 °С. Рибофлавин

кристаллизуется из воды, 2 N раствора уксусной кислоты и пиридина. Растворимость рибофлавина в воде плохая: при 27 °С – 0,12 мг/мл, при 40 °С – 0,19 мг/мл и при 100 °С – 2,3 мг/мл. Витамин хуже растворяется в спиртах и не растворим в органических растворителях (ацетон, хлороформ, эфир). Растворимость рибофлавина повышается при подкислении среды. Нейтральные и слабощелочные растворы рибофлавина имеют желтую окраску и поглощают свет в районе 450 нм; кислые растворы витамина имеют спектр поглощения с максимумом при 385 нм. Спектр флуоресценции находится в желто-зеленой области с максимумом при 525 нм (рН 6–8). Рибофлавин стабилен в кислых водных растворах, а в щелочной среде быстро разрушается (в 0,1 N растворе NaOH за 24 часа).

Под действием света и, особенно, ультрафиолетовых лучей растворы рибофлавина подвергаются фотолизу с образованием люмифлавина, люмихрома и других изоаллоксазинов с укороченной боковой цепью. Люмифлавин (7,8,10–триметилизоаллоксазин) образуется в щелочной среде, а люмихром (7,8–диметилаллоксазин) образуется при любых значениях рН, особенно в нейтральной и кислой среде. Спектры поглощения люмифлавина аналогичны рибофлавинову, но люмифлавин растворим в хлороформе. Нейтральные водные и хлороформные растворы люмихрома имеют голубую флуоресценцию. Спектр поглощения в воде 220, 262 и 356 нм; в спирте 221, 260, 339 и 387 нм.

Биологическая активность витамина зависит от его химического строения: абсолютно необходимы рибитол, незамещенные метильные группы в изоаллоксазиновом кольце и анионные фосфатные группы в ФМН и ФАД.

ФМН в 200 раз лучше, чем рибофлавин, растворим в воде. Бензиловый спирт применяют для грубого разделения ФМН от растворимого в этом спирте рибофлавина. В этаноле ФМН растворим плохо и нерастворим в ацетоне, хлороформе и эфире. Спектр поглощения ФМН в воде: 266, 373 и 445 нм. Максимум желто-зеленой флуоресценции при 525 нм, причем интенсивность флуоресценции ФМН изменяется незначительно в диапазоне рН 3–8. ФМН относительно устойчив в кислых водных растворах, но при нагревании подвержен кислотному гидролизу с выделением ортофосфата. В присутствии щелочей происходит быстрое расщепление пиримидинового кольца. Для стабилизации молекулы ФМН в растворе используют ЭДТА.

ФАД растворим в воде, но не растворим в этаноле и других органических растворителях. В присутствии щелочи ФАД быстро разрушается. В 10% растворе ТХУ при 38 °С за 2 часа 85% ФАД гидролизуеться до ФМН. Максимумы спектра поглощения водного раствора ФАД 263, 375 и 450 нм. Максимальная желто-зеленая флуоресценция такого раствора наблюдается при 520–530 нм; интенсивность флуоресценции тесно связана с величиной рН растворов.

Витамин В₂ в экосистемах.

Биосинтез флавинов осуществляют растительные и многие бактериальные клетки, дрожжи и плесневые грибки. У млекопитающих потребности в витамине В₂ обеспечиваются за счет микроорганизмов пищеварительного тракта. В продуктах растительного происхождения меньше витамина, чем в тканях животных (таблица 1).

Таблица 1

Содержание суммарного витамина В₂ в пищевых продуктах, мкг/г [2]

Продукт	Витамин В ₂	Продукт	Витамин В ₂
Печень быка	39,6–46,6	Дрожжи пивные, сухие	40
Почки быка	36,4	Дрожжи пекарские, прессованные	20,7
Сердце быка	9,0	Зерно ржаное	3,0
Яйцо куриное	8,0	Мука ржаная	2,0
Язык говяжий	2,7	Зерно кукурузное	1,0
Мышцы теленка	2,5	Зерно пшеничное	2,0
Мышцы быка	1,7	Пшеничные зародышки	13,0
Мышцы свиньи	1,6	Пшеничная мука, в.с.	0,3
Мышцы гуся	1,9	Пшеничные отруби	3,0
Мышцы утки	1,9	Хлеб бородинский	3,1
Мышцы кур	1,6	Хлеб пшеничный	0,7–1,2
Мышцы трески, с.м.	1,0	Крупа овсяная	1,4
Мышцы рыб	0,8	Крупы манная, перловая	1,0
Молоко коровье	1,9	Рис	0,3
Молоко козье	1,8	Шпинат	2,0
Молоко женское	0,2–0,4	Горошек зеленый	1,9
Сливки	1,4	Салат	0,8
Творог	5,0	Капуста цветная	1,0
Орехи миндальные	6,7	Капуста белокочанная	0,5
Орехи грецкие	1,3	Картофель	0,5
Орехи арахис	1,2	Морковь	0,6
Малина	0,7	Томаты	0,4
Земляника	0,6	Огурцы	0,4
Вишня	0,6	Виноград	0,06–0,22
Абрикосы	0,6	Виноградный сок	0,003–0,06
Груши, сливы	0,4	Вина красные	0,103–0,245
Яблоки, апельсины	0,3	Вина белые	0,08–0,133
Клюква	0,2	Чай	6,0–10,0

В дрожжах, животных и растительных тканях значительная часть флавинов находится в прочно связанной форме, отделяемой либо длительным протеолизом, либо многократными экстракциями 0,2% раствором NaOH. В молоке прочно связанного с белком ФАД не найдено.

Абсорбция, транспорт, метаболизм и экскреция [1,2].

Коферментные формы витамина В₂ (чаще ФАД, реже ФМН) освобождаются от нековалентных связей с белками в кислом содержимом желудка. В верхних отделах

кишечника пиррофосфатазы и фосфатазы дефосфорилируют ФАД и ФМН. Небольшой процент 8 α -(аминокислотные остатки) рибофлавинов (например, сукцинатдегидрогеназа митохондрий или моноаминоксидазы) освобождается от апопротеинов с помощью протеолитических ферментов.

Витамин первично абсорбируется в проксимальных отделах тонкого кишечника. Интенсивность всасывания пропорциональна концентрации витамина до уровня 66,5 мкмоль (25 мг) рибофлавина. Желчные кислоты изменяют скорость всасывания витамина. Небольшое количество рибофлавина участвует в кишечно-печеночной рециркуляции веществ. Активный транспорт низких концентраций витамина является Na⁺-зависимым и требует фосфорилирования.

В крови рибофлавин циркулирует в связи с альбумином и в небольшом количестве – с другими белками (иммуноглобулинами).

Внутри клеток рибофлавин проникает по механизму облегченной диффузии (рибофлавин-связывающий белок был найден в мембранах клеток печени). Скорость поступления рибофлавина в клетку определяется активностью флавокиназы, а также от скорости неспецифического дефосфорилирования коферментных форм витамина.

При всасывании рибофлавин в слизистой оболочке кишечника фосфорилируется до ФМН и ФАД. Этот процесс продолжается в других тканях. Флавокиназа (АТФ:рибофлавин 5'-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.26) ингибируется многими структурными аналогами рибофлавина, а ФАД-синтетаза (АТФ: ФМН аденилтрансфераза, КФ 2.7.7.2) менее специфична и катализирует образование динуклеотида не только из ФМН, но и из других аналогов ФМН. В тканях на долю ФАД приходится 15,9–39,8 мкг/г (75,0–90,0%). Содержание ФМН колеблется в пределах 9,7–28,4%, а на долю свободного рибофлавина приходится 0,3–2,6%. При моделировании алиментарной недостаточности витамина В₂ установлено, что смерть наступает при сохранении 30% запасов витамина в тканях. При алиментарном увеличении общего количества витамина В₂ в тканях соотношение ФАД:ФМН практически не изменяется.

Превращение рибофлавина в ФМН и ФАД происходит в цитозоле клеток, особенно в энтероцитах, печени, сердце и почках. Вначале флавокиназа катализирует образование ФМН. Этот кофактор легко комплексируется со специфичными апоферментами, образуя семейство флавопротеинов. Большая часть ФМН превращается в ФАД на следующем этапе (синтетаза, или пиррофосфорилаза). Тироксин и трийодтиронин стимулируют синтез ФМН и ФАД за счет функционирования гормонально-чувствительной формы флавокиназы. Конечный продукт – ФАД способен ингибировать эту реакцию. ФАД также связывается с апоферментами, образуя флавопротеины. Менее 10% ФАД может также ковалентно связываться со специфическими аминокислотными остатками ряда важных апоферментов.

Обмен флавопротеинов требует внутриклеточного протеолиза и дальнейшей деградации кофакторов, включая неспецифическое расщепление ФАД до АМФ и ФМН, и действие не специфичной фосфатазы на ФМН.

В организме человека распадается 90% поступившего рибофлавина. У людей с мочой выводится до 60% терапевтической дозы рибофлавина. У крыс в течение часа выделяется 20% введенного парэнтерально в терапевтической дозе ¹⁴C-рибофлавина,

при этом наибольшее содержание метки обнаруживается в почках; в тонком кишечнике соотношение меченых рибофлавина, ФМН и ФАД составляло 70:20:10. В моче находят ряд продуктов деградации рибофлавина: 7- и 8-гидроксиметилфлавины (образуются в процессе микросомального окисления рибофлавина), меньшие количества люмихрома, 10-формилметилфлавина и 10-(2'-гидроксиэтил) флавина (образуются за счет катаболизма кишечной микрофлорой), следы 8 α -флавиновых пептидов (продукты глубокого катаболизма флавопротеинов). У нормально питающихся взрослых здоровых людей с мочой выделяется флавины 60-70%, 7-гидроксиметилрибофлавин 10-15%, 8 α -сульфонилрибофлавин 5-10%, 8-гидроксиметилрибофлавин 4-7%, эфиры рибофлавинильных пептидов 5%, 10-гидроксиэтилфлавин 1-3%, следы люмифлавина и переменные количества 10-формилметилфлавинов и карбоксиметилфлавинов.

В молоке животных и человека обнаруживаются высокие концентрации флавинов, причем около 30% приходится на ФАД. При пастеризации молока большая часть ФАД гидролизует до ФМН. Следует указать на достаточно высокое содержание 10-(2'-гидроксиэтил) флавина, которому приписывают антивитаминную активность на уровне конкурентного ингибирования как клеточного захвата витамина, так и катализируемого флавокиназой фосфорилирования рибофлавина. В коровьем молоке этого метаболита может быть до 10-12% от всех флавинов. В меньших количествах в молоке обнаруживают 7- и 8-гидроксиметилрибофлавины, а также следы 10-формилметилфлавина и люмихрома.

Биохимические и физиологические функции [3].

В составе коферментных форм рибофлавинов участвует в окислительно-восстановительных реакциях в ряде метаболических процессов и в дыхательных цепях. Различают два типа реакций, катализируемых флавопротеидами: 1) простые дыхательные системы – это прямое окисление субстрата с участием кислорода, перенос на него атомов водорода с образованием H_2O_2 и выделением энергии в виде тепла: оксидазы L- и D-аминокислот; ксантиноксидаза (при деградации пуриновых азотистых оснований); альдегиддегидрогеназа (деградация альдегидов); 2) участие в сложных дыхательных системах (полная и укороченная цепи переноса электронов во внутренней мембране митохондрий): сукцинатдегидрогеназа (дегидрирование метаболита цикла трикарбоновых кислот сукцината и направление протонов и электронов в укороченную дыхательную цепь); ацил-КоА-дегидрогеназа (первое дегидрирование ацил-КоА в β -окислении жирных кислот и направление протонов и электронов в укороченную дыхательную цепь); глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (транспорт восстановительных эквивалентов через внутреннюю мембрану митохондрий-челночный α -глицерофосфатный механизм в печени и дыхательных мышцах насекомых); НАДН-дегидрогеназа (перенос протонов и электронов от НАДН+ H^+ матрикса митохондрий в полную цепь переноса протонов и электронов во внутренней мембране митохондрий; разделение потоков протонов и электронов с помощью FeS-белков; дигидролипоилдегидрогеназа (фермент окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, переносящий протоны и электроны с восстановленного ФАД на НАД $^+$ и последующем введении их в полную цепь переноса электронов в митохондриальной внутренней мембране). ФАД и FeS-белки являются компонентом системы микросомального окисления ксенобиотиков.

Клиническая картина рибофлавин-дефицитного состояния может быть получена при хронической недостаточности рибофлавина в пище, введении антагонистов типа галактофлавина или сочетании обоих состояний. При дефиците витамина В₂ и витамина РР развивается пеллагра. Многие симптомы дерматита исчезают при сочетанной терапии витаминами РР и В₂.

При дефиците витамина В₂ у людей развиваются хейлоз (поражение уголков рта), ангулярный стоматит, глоссит (воспаление языка), поражения глаз (фотофобия, кератит, прорастание сосудов в роговую оболочку, катаракта). Возможно развитие метаболических нарушений сердечной мышцы и анемии. При остром авитаминозе В₂ возможно развитие комы. При подавлении кишечной микрофлоры антибиотиками и сульфаниламидными препаратами возможно проявление гиповитаминоза В₂, т.к. рибофлавин может образовываться кишечной микрофлорой. Особая чувствительность эпителиальных тканей полости рта к недостатку рибофлавина обосновывает необходимость создания лекарственных форм и профилактических препаратов с включением витамина В₂.

Гиповитаминоз В₂ и экология человека [1].

Как правило, изолированной недостаточности витамина В₂ не бывает; чаще недостаточность рибофлавина является компонентом В-полигиповитаминоза, а также встречается у анорексичных пациентов. Недостаточность рибофлавина может возникать при нарушениях пищеварения и всасывания. Так, например, дефицит лактазы кишечника и связанное с этим уменьшение потребления молока снижает поступление витамина В₂. Аналогичный эффект возможен при мальабсорбционных состояниях и хронических воспалительных заболеваниях пищеварительного тракта. Генетические дефекты, имеющие региональную распространенность, могут определять серьезные метаболические нарушения: недостаточность митохондриальной ФАД-зависимой дегидрогеназы для ацил-КоА с различной длиной углеводородных цепей жирнокислотных остатков. У детей и подростков развивается миопатия, связанная с накоплением липидов, и сопровождаемая недостаточностью карнитина и глютаровой ацидурией. У многих пациентов с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы связана также ФМН-зависимая недостаточность пиридоксин-5-фосфат оксидазной активности эритроцитов. У таких людей ускорено превращение ФМН в ФАД. Напротив, при гетерозиготной форме β-талассемии ослаблено превращение рибофлавина в ФМН и ФМН в ФАД.

Нарушения метаболизма рибофлавина связаны также с изменениями процесса биосинтеза тиреоидных гормонов, при приеме оральных контрацептивов и дериватов фенотиазина. Повышенное разрушение рибофлавина отмечают при фототерапии неонатальной желтухи за счет фотохимической деструкции боковой цепи витамина. Ксенобиотик фенобарбитал, являясь индуктором микросомального окисления, может нарушать метаболизм рибофлавина на уровне метильной группы в 7 положении. При катаболических состояниях усиливаются потери витамина В₂ (как элемент отрицательного азотистого баланса), этот процесс усиливают антибиотики и фенотиазины.

Таким образом, нарушения обеспеченности организма рибофлавином зависят от региона проживания, характера питания, наличия врожденных нарушений метаболизма,

действия ксенобиотиков, излучений, состояния пищеварительного тракта, эндокринной системы.

Нарушение всасывания рибофлавина наблюдается при различных заболеваниях пищеварительного тракта (при хроническом гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, заболеваниях печени и желчного пузыря), а также при лечении антибиотиками, которые подавляют жизнедеятельность кишечной микрофлоры [4–6]. При недостатке витамина В₂ страдают прежде всего эпителиальные ткани ротовой полости, глаз и кожи, поэтому рибофлавин успешно применяется в дерматологии [7, 8]. Рибофлавин входит в состав зрительного пурпура, защищая сетчатку от избыточного воздействия ультрафиолетовых лучей. На этом основано использование витамина В₂ в офтальмологии для лечения заболеваний сетчатки, при глаукоме, гемералопии, язвах роговой оболочки, катаракте [9–11]. Опубликованы обнадеживающие результаты об использовании рибофлавина для лечения стоматитов, при нарушениях выделения слюны, при хейлозе и профилактике кариеса [12, 13]. Роль рибофлавина в механизмах развития воспалительных реакций и функционировании системы иммунитета изучена недостаточно, но применение этого витамина при заболеваниях, связанных с воспалительной реакцией и нарушениями иммунитета (ревматизм, клинические формы атеросклероза) дало положительные результаты [6, 14]. Благодаря участию рибофлавина в полной и укороченной дыхательных цепях митохондрий, витамин В₂ нашел широкое применение при лечении гипоксических состояний (легочно-сердечная недостаточность, различные виды ишемии) [6]. Большой популярностью пользуются кислородные коктейли с сукцинатом для повышения работоспособности мышц (кардиодистрофия, спортивные нагрузки). Витамин В₂ необходим для нормальной деятельности центральной нервной системы и рецепторного аппарата, нормализует углеводнофосфорный обмен клеток мозга при шоке, участвует в регуляции процессов торможения и способен уменьшать выраженность процессов возбуждения в коре [15, 16]. Рибофлавин является незаменимым фактором роста, беременности, лактации; витамин В₂ целесообразно применять в геронтологии для профилактики ускоренного развития возрастных нарушений обмена веществ [17, 18]. Положительный эффект введения рибофлавина найден при лечении инфекционных заболеваний и лихорадочных состояний, лечении методом гипербарооксигенации, терапии гематологических заболеваний и отравлений [19]. Пятикратное снижение концентрации рибофлавина в крови больных алкоголизмом обосновывает введение витамина В₂ в комплексную терапию алкогольной болезни [20].

Перечисленные и многие другие области применения рибофлавина свидетельствуют о неспецифическом характере действия витамина на уровне энергетического обмена и обезвреживания ксенобиотиков. Это привело к постепенному снижению интереса исследователей к рибофлавинолу в 80-х годах прошлого века. Однако в середине 90-х годов XX века в Институте питания РАМН был разработан и испытан доступный алгоритм анализа витаминной обеспеченности организма в норме и при патологии, включающий определение рибофлавина в плазме крови и эритроцитах, продуктов метаболизма витамина В₂ в моче (экскреция за 1 час), а также активность и степень активации экзогенным ФАД глутатионредуктазы эритроцитов – витамин В₂ – зависимого

фермента [21-23]. Этот алгоритм исследований целесообразно применять не только в медицине, но и при решении валеологических проблем и задач экологии человека.

Суточная потребность и источники рибофлавина [1].

Источники: витамин В₂ широко представлен в продуктах питания – молоко, печень, почки, сердце, дрожжи и др. Суточная потребность: 1–3 мг.

Важные соотношения: 1 мкмоль соответствует 0,376 мг рибофлавина, 1 мг соответствует 2,66 мкмоль рибофлавина. Клинические наблюдения показали, что потребление рибофлавина более 0,4 мг/ккал препятствует развитию гиповитаминозного состояния, свыше 0,5 мг/ккал повышают тканевые резервы витамина и его выделение с мочой, доза 0,6 мг/1000 ккал является приемлемой для лиц любого возраста. В таблице 2 приведены рекомендуемые величины потребления витаминов группы В [1].

Таблица 2

Суточная потребность в водорастворимых витаминах группы В

Группа	Возраст	В ₁ , мг	В ₂ , мг	В ₅ , мг	В ₆ , мг	В ₉ , мкг	В ₁₂ , мкг
Дети	0,0–0,5	0,3	0,4	5	0,3	25	0,3
	0,5–1,0	0,4	0,5	6	0,6	35	0,5
	1,0–3,0	0,7	0,8	9	1,0	50	0,7
	4,0–6,0	0,9	1,1	12	1,1	75	1,0
	7–10	1,0	1,2	13	1,4	100	1,4
Муж.	11–14	1,3	1,5	17	1,7	150	2,0
	15–18	1,5	1,8	20	2,0	200	2,0
	19–24	1,5	1,7	19	2,0	200	2,0
	25–50	1,5	1,7	19	2,0	200	2,0
	51+	1,2	1,4	15	2,0	200	2,0
Жен.	11–14	1,1	1,3	15	1,4	150	2,0
	15–18	1,1	1,3	15	1,5	180	2,0
	19–24	1,1	1,3	15	1,6	180	2,0
	25–50	1,1	1,3	15	1,6	180	2,0
	50+	1,0	1,2	13	1,6	180	2,0
Берем.		1,5	1,6	17	2,2	400	2,2
Лактация		1,6	1,8	20	2,1	280	2,6

У пожилых людей с энергетическими тратами менее 2000 ккал требуется минимум 1,2 мг рибофлавина в сутки. При кормлении грудным молоком выделяется в среднем 35 мкг рибофлавина в 100 мл молока; примерно 0,26 мг за сутки (750 мл молока) в первые 6 месяцев кормления и 0,21 мг за сутки (600 мл) в последующие 6 месяцев кормления. Поскольку 70% рибофлавина молока утилизируется, в первые полгода необходимо дозу рибофлавина увеличить на 0,5 мг, а во второй половине года – на 0,4 мг в сутки.

Количественное определение флавинов

Спектрофотометрические методы применяют при высокой концентрации флавинов (5 мкг/мл и выше), когда присутствием мешающих примесей пренебрегают.

При низкой концентрации флавинов применяют спектрофотофлуориметрические методы, которые разделяют на две подгруппы. В первую входят методы оценки собственной флуоресценции рибофлавина или его природных производных ФМН и ФАД («рибофлавиновая флуоресценция»), во вторую – методы, в основе которых лежит фотолитическое превращение природных флавинов в люмифлавины («люмифлавиновая флуоресценция»). Метод «люмифлавиновой флуоресценции» имеет преимущества при определении флавинов в небольших количествах биологического материала или при низком содержании витамина В₂ в исследуемом материале: при фотолизе в щелочной среде рибофлавин превращается в более ярко флуоресцирующий люмифлавин [2, с. 24].

В состоянии адекватного питания флуориметрическим методом находят нормальную суточную экскрецию флавинов с мочой более, чем 0,32 мкмоль (120 мкг), или 0,21 мкмоль (80 мкг) на 1 г креатинина. Скорость экскреции выражается в мкг/г креатинина; при дефиците рибофлавина она <27 мкг/г креатинина. Флуориметрическим методом определяют содержание флавинов и в эритроцитах: в норме содержание превышает 40 нмоль (15 мкг/дл), при дефиците рибофлавина содержание флавинов в эритроцитах обычно ниже 27 нмоль (10 мкг/дл). Отметим, что более эффективным методом оценки рибофлавинового статуса является определение ФАД-зависимой глутатионредуктазы в лизированных эритроцитах. Определяют активность фермента в гемолизатах до и после добавления ФАД. Результат оценивают как «коэффициент активности», или «ФАД-эффект» по разности изменения оптической плотности в присутствии ФАД и его отсутствии. Этот коэффициент отображает степень стимуляции апофермента при добавлении кофактора. В норме величина коэффициента меньше 1,2, недостаточность рибофлавина 1,2–1,4, а при повышении коэффициента выше значений 1,4 говорят о витамин-дефицитном состоянии.

Более чувствительными считаются методы, основанные на специфическом связывании (с яичным рибофлавином-связывающим протеином, ФМН с апофлавоксином, ФАД с апопротеинами оксидаз D-аминокислот или глюкозооксидазы). Методы ВЭЖХ позволяют оценивать содержание отдельных представителей флавинов. Микробиологический тест позволяет оценить количество витамина В₂ в среде по интенсивности роста микроорганизмов.

Метод количественного определения рибофлавина с помощью рибофлавиносвязывающего апобелка (РБСБ) куриного яйца основан на уникальном свойстве этого белка избирательно и с высоким сродством ($K_d=1-4$ нМ) в эквимолярном соотношении связывать рибофлавины, что приводит к полной потере флуоресценции, характерной для свободного рибофлавина. Сродство апобелка к рибофлавины не изменяется в диапазоне рН 6-9, диссоциация рибофлавина от белка происходит при закислении среды при рН 3-4. Сродство ФМН и ФАД к РБСБ на три и четыре порядка ниже, чем рибофлавина. Не обнаружено ни одного аналога рибофлавина, обладающего более высоким сродством, чем природный лиганд. При связывании рибофлавина интенсивность флуоресценции самого белка снижается на 86%. Разница между интенсивностью флуоресценции гид-

ролизата биологического образца до и после добавления РБСБ позволяет избирательно и с высокой чувствительностью определять концентрацию рибофлавина.

Выделение рибофлавинсвязывающего апобелка из белка куриных яиц [25] проводят при комнатной температуре по компилятивной методике Tillotson J.A., Bashor M.M., White H.B.

Реагенты и их приготовление.

1. 5% водный раствор фенола (C_6H_5OH).
2. 0,1 N раствор соляной кислоты (HCl).
3. 500 mM трис-HCl буфер, pH 7,5.
4. 50 mM трис-HCl буфер, pH 7,5.
5. 0,4 M хлорид натрия (NaCl), приготовленный на 50 mM трис-HCl буфере, pH 7,5.
6. 6 mM раствор соляной кислоты (HCl).
7. 250 mM Na-ацетатный буфер, pH 3,2.
8. 25 mM Na-ацетатный буфер, pH 3,2.
9. 25 mM Na-ацетатный буфер, pH 5,8.

Выделение РБСБ начинают с гомогенизации белков 2–10 свежих куриных яиц в гомогенизаторе Поттера (стекло-тефлон) до однородной вязкости. Затем добавляют сухой NaCl до концентрации 20% (вес/объем) при постоянном перемешивании механической мешалкой. Затем к полученной суспензии приливают равный объем 5% водного раствора фенола и центрифугируют 10 мин при 1500 g. С помощью ваты снимают верхнюю пленку.

Супернатант желтого цвета диализуют 5 ч против 100 объемов дистиллированной воды (5–8 смен) и в течение ночи против 20 объемов 50 mM трис-HCl pH 7,5, затем центрифугируют.

Надосадочный раствор наносят на колонку (1,2×7 см) DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенную 50 mM трис-HCl буфером pH 7,5. После нанесения РБСБ виден в виде желтой зоны в верхней части колонки. Колонку промывают буфером нанесения до тех пор, пока поглощение элюата при 280 нм не станет ниже 0,010.

Флавопротеин элюируют 0,4 M NaCl, приготовленным на 50 mM трис-HCl буфере, pH 7,5. При элюции с колонки собирают визуально видимые ярко окрашенные фракции, содержащие флавопротеин. Фракции флавопротеина в замороженном состоянии при -20 °C могут храниться до 6 месяцев.

Полное отделение рибофлавина от флавопротеина можно проводить двумя способами: с помощью диализа против 6 mM HCl до полного обесцвечивания диализата или хроматографией на колонке KM-целлюлозы. Для этого элюированные с DEAE-Sephadex A-50 фракции флавопротеина диализуют против 20 объемов 25 mM Na-ацетатного буфера, pH 3,2 с трехкратной заменой диализирующего буфера в течение 16 часов. Затем наносят на колонку (1×10 см) KM-целлюлозы (Reanal, Венгрия), предварительно уравновешенную 25 mM Na-ацетатным буфером, pH 3,2. После нанесения РБСБ также виден на колонке в виде желтой зоны, так как не весь рибофлавин диссоциирован от РБСБ. Для удаления рибофлавина колонку промывают буфером нанесения

до полного исчезновения желтой окраски на колонке и уменьшения экстинкции в элюируемом растворе до величины меньше 0,010 при 455 нм. Апопротеин элюируют 25 мМ Na-ацетатным буфером, pH 5,8, измеряя поглощение элюата при 280 нм. Собирают фракции с экстинкцией более 0,100.

Фракции апопротеина, полученные с помощью диализа или хроматографии диализуют против 100 объемов дистиллированной воды в течение ночи, хранят при -20 °С в течение года. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия полученный обоими способами препарат апобелка содержит не менее 89% пептида с кажущейся молекулярной массой около 36000. Из белка двух яиц получают 30-40 мг апобелка. Концентрацию используемых растворов рибофлавина и РБСБ определяют спектрофотометрически (коэффициент молярной экстинкции рибофлавина при 455 нм – $1,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, для РБСБ при 282 нм – $4,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [25].

Учитывая малый тираж учебно-методического пособия ГУ НИИ питания РАМН и важность оценки рибофлавинового статуса населения Беларуси, мы посчитали необходимым привести методики алгоритма определения обеспеченности населения по витамину В₂ [25].

1. Определение рибофлавина в моче флуоресцентным методом титрования рибофлавинсвязывающим апобелком. Метод основан на способности РБСБ при связывании с рибофлавином тушить его флуоресценцию. Реагенты: 0,1 N HCl; стандартный раствор рибофлавина (C₁₇H₂₀N₄O₆) с концентрацией 100 мкг/см³; рабочий раствор рибофлавина с концентрацией 2 мкг/см³; 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,5; РБСБ со связывающей способностью 5–15 мкг рибофлавина на 1 мг белка. Интенсивность флуоресценции измеряют в кварцевой кювете объемом 3 см³ с длиной оптического пути 1 см при длине волны возбуждающего света 465 нм, испускаемого света 525 нм. Ход определения: к 0,1 см³ мочи добавляют 3 см³ 50 мМ трис-HCl буфера pH 7,5, измеряют флуоресценцию (А), добавляют 0,030 см³ рабочего стандартного раствора рибофлавина с концентрацией 2 мкг/см³, измеряют флуоресценцию (С), затем добавляют по 0,030 см³ раствора РБСБ, перемешивают, измеряют флуоресценцию после каждой добавки белка. Добавление белка продолжают до тех пор, пока флуоресценция после двух добавок перестает снижаться (В). Разница флуоресценции пропорциональна количеству рибофлавина в моче. Поскольку при добавлении стандарта рибофлавина и РБСБ объем в кювете увеличивается, величины С' и В' рассчитывают с учетом разведения, умножая С и В на соответствующее разведение.

Обработка результатов: часовую экскрецию рибофлавина с мочой рассчитывают по формуле

$$\frac{(A - B') \times 0,06 \times V \times 60}{(C' - A) \times t \times 0,1} \text{ мкг/ч, где } V \text{ – объем мочи, собранной натощак (в см}^3\text{) за}$$

время t (мин); 60 – коэффициент пересчета мин в ч, 0,06 – количество добавленного в пробу рибофлавина, мкг; 0,1 – объем мочи, взятой на анализ, мл.

Метрологические характеристики метода: предел обнаружения 0,03 мкг в 1 мл мочи; диапазон измеряемых концентраций в моче 0,05–10 мкг/мл; воспроизводимость 6,4%, правильность 97,1%, относительная сходимость 18,0%.

2. Определение рибофлавина в слюне флуоресцентным методом титрования рибофлавинсвязывающим апобелком. Реагенты: 100% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 4 М раствор калия гидроортофосфата (K_2HPO_4); Стандартный раствор рибофлавина с концентрацией 100 мкг/мл; РБСБ со связывающей способностью 5–15 мкг рибофлавина на 1 мг белка. Ход определения: к 1 мл отцентрифугированной слюны добавляют 0,1 мл 100% ТХУ, центрифугируют. К 0,9 мл надосадочной жидкости добавляют 0,4 мл 4М K_2HPO_4 и 1,3 мл воды дистиллированной, перемешивают, измеряют флуоресценцию (А), добавляют 0,030 мл рабочего стандартного раствора рибофлавина с концентрацией 0,5 мкг/мл, измеряют флуоресценцию (С), затем добавляют по 0,030 мл раствора РБСБ, перемешивают, измеряют флуоресценцию после каждой добавки белка. Добавление белка продолжают до тех пор, пока флуоресценция после двух добавок перестает снижаться (В). Обработка результатов: расчет содержания рибофлавина в слюне

$$\frac{(A - B) \times 0,015 \times 1,1}{(C - A) \times 0,9 \times 1} \text{ мкг/мл, где } 1,0 \text{ – объем слюны, взятой на анализ, мл; } 1,1 \text{ –}$$

разведение слюны после добавления ТХУ; 0,015 – количество добавленного в пробу рибофлавина, мкг; 0,9 – объем надосадочной жидкости, взятой на анализ, мл.

3. Определение рибофлавина в плазме (сыворотке) крови флуоресцентным методом титрования рибофлавинсвязывающим апобелком. Реагенты: 0,1 N раствор HCl; стандартный раствор рибофлавина с концентрацией 100 мкг/см³; рабочий стандартный раствор рибофлавина с концентрацией 0,5 мкг/см³; 4 М раствор калия гидроортофосфата; 100 об% ТХУ; рибофлавинсвязывающий белок со связывающей способностью 5–15 мкг рибофлавина на 1 мг белка. Ход определения: к 1 см³ плазмы добавляют 0,1 см³ 100% ТХУ и центрифугируют 3000g 5 мин. К 0,6 см³ надосадочной жидкости добавляют 0,2 см³ 4 М K_2HPO_4 и 2 см³ воды, измеряют флуоресценцию (А), добавляют 0,030 см³ рабочего стандартного раствора рибофлавина с концентрацией 0,5 мкг/мл, повторяя измерение (С), и титруют РБСБ как в случае мочи (В). Расчет содержания рибофлавина в плазме (сыворотке) крови:

$$\frac{(A - B) \times 15 \times 1,1}{(C - A) \times 0,6 \times 1,0} \text{ нг/мл, где } 1,0 \text{ – объем плазмы (сыворотки) крови, взятой на}$$

анализ, см³; 1,1 – разведение плазмы (сыворотки) крови при добавлении ТХУ; 1,5 – количество добавленного в пробу рибофлавина, нг; 0,6 – объем надосадочной жидкости, взятой на анализ, см³.

Метрологические характеристики метода: предел обнаружения 1,0 нг в 1 мл плазмы; диапазон измеряемых концентраций в плазме 1,5–40 нг/мл; воспроизводимость 8,7%; правильность 101,9%; относительная сходимость 24%.

4. Определение рибофлавина в эритроцитах люмифлавиновым методом основано на способности рибофлавина при облучении в щелочных условиях количественно переходить в люмифлавин, интенсивность флуоресценции которого измеряют после избирательной экстракции хлороформом. Реагенты: 0,1 N HCl; стандартный раствор рибофлавина с концентрацией 100 мкг/см³; рабочий стандартный раствор рибофлавина с концентрацией 0,5 мкг/см³; 20% ТХУ; 1,5 М раствор NaOH; ледяная уксусная кислота;

хлороформ. Интенсивность флуоресценции измеряют в кварцевой кювете объемом 3 см³ с длиной оптического пути 1 см при длине волны возбуждающего света 430 нм, испускаемого – 532 нм. Ход определения: к 1,0 см³ гемолизата эритроцитов (1:1) добавляют 2,0 см³ воды и 1,0 см³ 20% ТХУ, перемешивают и выдерживают 1 ч при 37 °С, затем центрифугируют при 3000 g 5 мин. К 1 см³ центрифугата добавляют 1 см³ 1,5 М NaOH и перемешивают (о – опыт). Для расчета количества рибофлавина используют внутренний стандарт, для чего к 1 см³ центрифугата добавляют 0,05 см³ раствора рибофлавина с концентрацией 0,5 мкг/мл и 1 см³ 1,5 М NaOH (с – стандарт). Обе пробы облучают люминесцентной лампой с расстояния 5–6 см в течение часа. Контрольная проба (1 см³+1 см³ 1,5 М NaOH) не облучают (к). Во все пробирки добавляют по 0,25 см³ ледяной уксусной кислоты, затем по 3 см³ хлороформа, осторожно встряхивают, через 10 мин отделяют водную фазу. В хлороформных экстрактах измеряют флуоресценцию. Обработка результатов:

$$\frac{(o - k) \times 8 \times 25}{(c - k)} \text{ нг/мл, где } 8 - \text{разведение эритроцитов, } 25 - \text{концентрация стан-}$$

дартного раствора рибофлавина в пробе, нг/мл.

Метрологическая характеристика метода: предел обнаружения 18 нг в 1 мл эритроцитов; диапазон измеряемых концентраций в эритроцитах 70–190 нг/мл; воспроизводимость 10,7%; правильность 98,9%, относительная сходимость 30%.

5. Определение рибофлавина в пищевых продуктах с помощью рибофлавинсвязывающего апобелка. Кислотный и ферментативный гидролиз пищевых продуктов: к навеске пищевого продукта добавляли около 150 мл 0,1 N HCl и помещали в кипящую водяную баню на 40 мин. Затем пробы охлаждали до комнатной температуры, довели значение pH насыщенным раствором уксуснокислого натрия до 4,5 потенциометрически. В каждую пробу добавляли по 0,1 г амилоризина и помещали в термостат при 37 °С на 14–16 ч. После ферментативного гидролиза пробы охлаждали до комнатной температуры, довели объем до 250 мл дистиллированной водой и фильтровали. Полученный гидролизат использовали для определения рибофлавина с помощью рибофлавинсвязывающего апобелка или люмифлавиновым методом. Оба метода могут дать отличающиеся величины содержания витамина B₂, поскольку титрование рибофлавинсвязывающим апобелком позволяет определить только свободный рибофлавин. В то же время при облучении в щелочной среде ФАД и ФМН, как и рибофлавин, фотолизируются до одного и того же продукта – люмифлавина, интенсивность флуоресценции которого впоследствии, после специфической экстракции хлороформом, определяется. Следует отметить, что люмифлавиновый метод многостадийный и трудоемкий, а при использовании титрования рибофлавинсвязывающим белком удается определить витамин B₂ за одну стадию.

В качестве примера приведем результаты параллельных исследований параметров транспорта липидов в сыворотке крови и концентрацию рибофлавина в слюне методом титрования РБСБ (таблица 3).

Приведенные результаты показали существование связи между концентрацией триглицеридов в сыворотке крови и содержанием рибофлавина в слюне.

Таблица 3

Содержание рибофлавина в слюне лиц с различными параметрами транспорта липидов

№	Общий холестерол, моль/л	ХС-ЛПВП, моль/л	ХС-ЛПНП, моль/л	Триглицериды, моль/л	Индекс атерогенности	Вит. В ₂ , мкг/мл
1	5,55	1,44	3,72	0,85	2,85	0,07
2	4,50	1,26	2,73	1,11	2,57	0,09
3	2,65	1,70	0,78	0,37	0,56	0,05
4	3,96	1,51	2,07	0,83	1,62	0,07
5	4,00	0,85	2,23	2,01	3,71	0,08
6	4,13	1,34	2,53	0,56	2,08	0,48

Из вышесказанного следует: определение рибофлавина необходимо включить в систему лабораторного мониторинга состояния здоровья человека. С этой целью может быть использован неинвазивный метод определения концентрации витамина В₂ в слюне. Для экологического мониторинга могут использоваться методы люмифлавинового анализа и титрования рибофлавина связывающим апопротеином.

Л и т е р а т у р а

1. *McCormick D.B. Riboflavin / Modern nutrition in health and disease* (eds. M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike). – 1994 «Williams and Wilkins», Vol. 1. – P. 366–375.
2. *Розанов А.Я.* Рибофлавин и флавиновые производные (витамин В₂) / Экспериментальная витаминология (справочное руководство), ред. Ю.М. Островский. – Минск: «Наука и техника», 1979. – С. 224–266.
3. *Чиркин А.А.* Курс лекций по биологической химии. Витебск: ВГМУ. – 312 с.
4. *Said H.M., Arianas P.* Transport of riboflavin in human intestinal brush border membrane vesicles // *Gastroenterology*, 1991. Vol. 100, № 1. – P. 82–88.
5. *Закусов В.В.* Клиническая фармакология. – М.: Медицина, 1978. – 608 с.
6. *Подорожный П.Г., Томашевский Я.И.* Клиническая витаминология. – Киев: Здоров'я, 1977. – 144 с.
7. *Гольдштейн В.Д.* Особенности витаминного обмена и методика витаминотерапии у больных туберкулезом легких. – М.: Медицина, 1971. – С. 12–16.
8. *Тищенко Л.Д.* Витамины в дерматологии. – М.: Медицина, 1987. – С. 28–30.
9. *Александровская В.И.* К вопросу о применении ретинола и рибофлавина с целью снижения утомления зрительного анализатора в условиях производства / В кн.: Физиология труда. Тез. докл. VII Всесоюзн. научн. конф. – Л., 1978. – С. 15–16.
10. *Нуритдинов В.А.* Особенности субконъюнктивального введения раствора рибофлавина-монопнуклеотида // *Вестник офтальмологии*. – 1974. – №4. – С. 73–75.

11. **Каржубаева Г.Г., Завадская Ю.С., Рахметова Ф.Л.** Обеспеченность витамином В₂ больных первичной глаукомой // *Здравоохранение Казахстана*. – 1984. – №12. – С. 53–55.
12. **Григорьева Л.П., Киндий С.В., Скрипникова Т.П.** Природные антиоксиданты в профилактике и лечении стоматологических заболеваний / В кн.: *Биофизические и физико-химические исследования в витаминологии*. – М.: Наука, 1981. – С. 117–119.
13. **Боровский Е.В., Грашиков М.Н., Патрикеев В.К.** Терапевтическая стоматология. – М.: Медицина, 1973. – 384 с.
14. **Авакумов В.М., Клементьева Р.П.** *Флавионат* // *Химико-фармацевтический журн.* – 1980. – т.14, №8. – С. 113–116.
15. **Gould J.** High potency vitamin therapy // *Russ. Med. Sper.* – 1981. – Vol. 28, № 4. – P. 224–256.
16. **Закс А.С., Бурди Н.З., Каитоненко Т.А., Суслина М.Л.** О Влияние рибофлавина на ЦНС / В кн.: *Изыскание, изучение действия и анализ синтетических и природных веществ*. – Пермь, 1985. – С. 41–44.
17. **Эфендиева М.** Обеспеченность тиамином и рибофлавином организма недоношенных детей первых двух месяцев жизни. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук, – М., 1980. – 22 с.
18. **Яковлев Т.Н.** *Лечебно-профилактическая витаминология*. – Л.: Медицина, 1981. – 200 с.
19. **Борзенко И.А.** Клинико-фармакологические аспекты применения рибофлавина и рибофлавиновых коферментов // *Врачебное дело*. – 1983. – №10. – С. 4–8.
20. **Кишко Н.М., Сабов В.А., Штильман Е.А.** Содержание некоторых витаминов в крови и моче больных алкоголизмом // *Врачебное дело*. – 1991. – № 2. – С. 64–66.
21. **Коденцова В.М., Алексеева И.А., Спиричев В.Б.** Особенности обмена рибофлавина при сахарном диабете // *Укр. биохим. журн.* – 1992. – т. 64, № 4. – С. 105–108.
22. **Вржесинская О.А., Коденцова В.М., Харитончик Л.А. и др.** Критерии обеспеченности организма детей, больных инсулинзависимым сахарным диабетом, витаминами В₁, В₂ и В₆ // *Вопр. мед. химии*. – 1995. – т. 41, № 6. – С. 58–62.
23. **Коденцова В.М., Успенская И.Д., Вржесинская О.А. и др.** Особенности витаминов группы В и критерии обеспеченности ими детей, страдающих целиакией // *Вопр. мед. химии*. – 1995. – т. 41, № 4. – С. 41–45.
24. **McCormick D.B. Wright L.D. (Eds)** *Vitamins and coenzymes / Methods in Enzymology*. Vol. 66. Part E. – New York: Academic Press, 1980.
25. **Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Рисник В.В. и др.** Выделение рибофлавинсвязывающего апобелка из белка куриных яиц и его использование для определения рибофлавина в биологических образцах // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1994. – т. 30, вып. 4–5. – С. 603–609.